



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 42 16 949 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 42 16 949.6  
㉑ Anmeldetag: 22. 5. 92  
㉒ Offenlegungstag: 2. 12. 93

㉓ Int. Cl. 5:  
**G 01 N 33/68**  
G 01 N 33/53  
G 01 N 33/566  
C 07 K 15/06  
C 07 H 21/04  
C 07 K 15/28

DE 42 16 949 A 1

㉔ Anmelder:  
Cremer, Christoph, Prof.Dr.Dr., 6900 Heidelberg, DE  
  
㉕ Vertreter:  
Sartorius, P., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 68535  
Edingen-Neckarhausen

㉖ Erfinder:  
Celeda, Dino, Dipl.-Biol., 6900 Heidelberg, DE;  
Bettag, Ulrich, Dr., 6730 Neustadt, DE; Cremer,  
Christoph, Prof. Dr. Dr., 6900 Heidelberg, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ㉗ Verfahren zur Präparierung und Hybridisierung von spezifischen Proben  
㉘ Verfahren zur In-situ-Hybridisierung (ISH) mittels markierter Nukleinsäureproben, wobei das Hybridisierungsgemisch keine oder nur sehr geringe Mengen an denaturierenden Agenzien enthält. Das Verfahren erlaubt die gleichzeitige Durchführung der ISH und immunologischer Färbetechniken in der gleichen Pufferlösung.

DE 42 16 949 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

## Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Präparierung und Hybridisierung von spezifischen Proben, insbesondere nativen Nukleinsäuren oder PNA-Proben, oder anderen künstlich hergestellten Proben, die eine spezifische Sequenz von Nukleotiden aufweisen, wobei die Proben mit modifizierten Nukleotiden markiert und durch In-situ-Hybridisierung mit den spezifischen Stellen des Zielobjekts hybridisiert werden. Als Zielobjekte werden hier chromosomale Strukturen in Eukaryonten angesehen, z. B. in menschlichen Zellen, in Zellen von Säugetieren und in pflanzlichen Zellen.

Es sind bereits Verfahren in der biomedizinischen Forschung bekannt, bei denen die Analyse von Chromosomen eine stetig wachsende Bedeutung erlangt. Beim Studium pathologischer Prozesse wurde beispielsweise eine enge Korrelation zwischen Chromosomenmorphologie und Malignität gefunden.

Die bisher bekannt gewordenen Mechanismen zur In-situ-Hybridisierung beruhen auf der Annahme, daß eine unmittelbare, sequenzspezifische Anlagerung der Proben-Nukleinsäure an die Zielobjekte bzw. Target-Nukleinsäure erfolgt, wobei sich zwischen Basen der Proben-Nukleinsäure und Basen der Zielobjekt-Nukleinsäure Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden.

In-situ-Hybridisierungs-Methoden haben bereits vielfältige Anwendungen erlangt, z. B. in der Tumorforschung, bei der Detektion Mutagen-induzierter Chromosomenaberrationen und in der dreidimensionalen Mikroskopie von Zellen.

Alle bei In-situ-Hybridisierung verwendeten Verfahren beruhen auf der Verwendung von Formamid oder anderen denaturierenden, die Denaturierung fördern oder erhaltenden chemischen Agenzien, bei denen das zu behandelnde zelluläre oder chromosomale Material als Zielobjekt bezeichnet wird.

Dies hat zur Folge, daß wegen der Wirkung dieser Agenzien auf immunologisch relevante Strukturen, z. B. Beeinträchtigung von Wasserstoff-Brückenbindungen, die normale IT-Färbung (immuntechnische Färbung z. B. von Zelloberflächenantigenen bei empfindlichen Strukturen wesentlich behindert sein kann.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, auch empfindliche, nicht-resistente, immunologische Strukturen bzw. Epitope gleichzeitig mit In-situ-Hybridisierung charakterisieren zu können.

Hierbei wird zunächst eine IT-Reaktion mit biotinylierten Antikörpern durchgeführt oder diese mit anderen hitzebeständigen resistenten Gruppen versehen, und anschließend werden die In-situ-Hybridisierungs-Prozeduren durchgeführt.

Andere Lösungen bestehen darin, Methoden anzuwenden, bei denen die thermale Denaturierung der Zielobjekt-DNS vermieden wird. Dies ist z. B. möglich durch entsprechende Mengenerhöhung bei dem Einsatz von denaturierenden oder die Denaturierung fördernden Agenzien. Hier sind beide als denaturierende Agenzien bezeichnet. So kann die Zielobjekt-DNS beispielsweise mit NaOH oder durch den Einsatz sehr hoher Konzentrationen von Formamid auch bei niedrigen Temperaturen in eine einzelsträngige denaturierte Form übergeführt werden. Empfindliche immunologische Strukturen sind gegenüber einer solchen Behandlung nicht genügend stabil. Als Alternative bieten sich Möglichkeiten eines Einsatzes enzymatischer Verfahren zur Produktion von einzelsträngiger Zielobjekt-DNS an, z. B. Exonukleasen. Jedoch wurde auch hier die

Hybridisierung mit einem Formamid-haltigen Puffersystem durchgeführt, wenn auch in geringerer Konzentration, als sie bei der Erzeugung nicht-enzymatischer, einzelsträngiger Zielobjekt-DNS bei niedrigen Temperaturen für erforderlich gehalten wurde.

Die gesamten bei In-situ-Hybridisierungen durchgeführten Hybridisierungs-Methoden gingen bisher davon aus, daß zu diesem Prozeß die Überführung von Zielobjekt-DNS in Duplex-Form in eine einzelsträngige Form notwendig sei; sie gingen davon aus, daß in der DNS enthaltene natürliche, einzelsträngige Abschnitte, z. B. hairpins, einzelsträngige Abschnitte aufgrund von Triplex-Faltungen, für die In-situ-Hybridisierung nicht ausreichend seien. Diese Annahme kann zwar für eine Reihe von Proben-DNS zutreffen. Es wurde z. B. festgestellt, daß bestimmte Proben aus komplementärer DNS nur dann an chromosomale Zielobjekte im Zellkern hybridisierten, wenn eine Hitzedenaturierung des Zielobjekts vorgenommen worden war. Es ist jedoch bekannt, daß die Bindungsfähigkeiten von natürlichen, einzelsträngigen Abschnitten stark von der Sequenz abhängen.

Ein weiterer, seit vielen Jahren aufgrund von Untersuchungen an synthetischen Nukleinsäuren postulierter Mechanismus besteht in der Verbindung von einzelsträngigen Nukleinsäuren mit doppelsträngigen Duplex-Nukleinsäuren zu dreisträngigen Triple-Formationen. Bei der Triple-Formation sind drei Nukleinsäurestränge, d. h. drei Stränge von Basen, in unmittelbarer Nachbarschaft voneinander angeordnet. Eine spezielle, an synthetischen Homopolynukleinsäuren gut untersuchte Form von Triple-DNS sind Triplex-Strukturen, die sich durch bestimmte Formen der Basenpaarung auszeichnen.

Alle dreisträngigen Formen von Nukleinsäuren bzw. Basensträngen sind hier unter dem Begriff Triple-Formation zusammengefaßt.

Ferner ist es bekannt, daß auch gemischte Sequenzen bzw. aus Purinbasen und Pyrimidinbasen bei der Triplexbildung zulässig sind. Für ein nicht-enzymatisches In-situ-Hybridisierungsverfahren bei niedrigen Temperaturen ( $T \leq 5^\circ\text{C}$ ) in Abwesenheit denaturierender Agenzien ist wesentlich, daß Triplebildungen, d. h. doppelsträngige Proben + einzelsträngige Proben (= Triple Strukturen), bekanntermaßen auch bei niedrigen Temperaturen und in Abwesenheit denaturierender Agenzien erfolgen. Diese Verfahren wurden bei der Hybridisierung in vitro mit isolierter DNS angewendet.

Alle bekannten In-situ-Hybridisierungsverfahren, verstanden als Verfahren zur sequenzspezifischen Anlagerung von Nukleinsäuren an Nukleinsäuren in Zielobjekten, z. B. in Zellen, mit dem Ziel einer Visualisierung der Anlagerungsorte zum Zwecke der Analyse, beruhen auf der Annahme, daß diese auf einer Anlagerung einzelsträngiger Proben-DNS/RNS an einzelsträngige Zielobjekt-DNS beruhen, die durch geeignete Denaturierungsverfahren, Hitzedenaturierung, denaturierende chemische Agenzien aus doppelsträngiger DNS in situ entstanden sei oder die durch enzymatische Behandlung aus nativer doppelsträngiger DNS gebildet worden sei.

Es ist zwar bekannt, daß auch in der nativen DNS einzelsträngige Abschnitte existieren könnten bzw. die Anlagerung einzelsträngiger DNS/doppelsträngiger DNS, z. B. in Form einer Triplex, erfolgen könnte; noch niemals wurden jedoch hieraus Konsequenzen für die Möglichkeit eines Verfahrens zur nicht-enzymatischen Niedrig-Temperatur-in-situ-Hybridisierung ohne denaturierende Agenzien gezogen.

Die Meinung, daß denaturierende Agenzien für eine erfolgreiche In-situ-Hybridisierung absolut notwendig seien, ist so stark, daß selbst Autoren, die eine In-situ-Hybridisierung bei niedrigen Temperaturen nach enzymatischer Behandlung durchführten, anschließend noch zusätzliche denaturierende Agenzien, also Formamid, verwendeten, ohne dies zu begründen. Ferner ist die Vorstellung, daß die doppelsträngige DNS durch Behandlung in einzelsträngige Zielobjekt-DNS überführt werden müsse, so stark verankert, daß die o.g. Autoren kein Kontrollexperiment durchführten, in dem auf enzymatische Behandlung verzichtet wurde.

Ferner ist es bekannt, daß einzelsträngige Proben, in denen das Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine Polyamidkette PNA ersetzt worden war, sich in einer sequenzspezifischen Weise mit doppelsträngiger DNS zu einer neuen Form dreisträngiger Formationen verbinden können, der DNS-PNA.

Es ist ferner bekannt, daß bei allen In-situ-Hybridisierungs-Verfahren denaturierenden Agenzien eine große Bedeutung beigemessen wurde, sogar bei den enzymatischen Verfahren werden sie im Verlauf des Hybridisierungsprotokolls angewandt. Wird z. B. Formamid verwendet, so senkt sich drastisch die Schmelztemperatur von ds-DNS. Aus weiteren energetischen Betrachtungen kann man erwarten, daß in Gegenwart von Formamid u. U. die Bildung von Triplex-DNS stärker gestört sein könnte als die Bildung von ds-DNS.

Chromosomale Proteine sind von erheblicher Bedeutung für die Tertiärstruktur der Chromosomen sowie der chromosomalen DNS. Veränderungen der Tertiärstruktur chromosomaler Proteine könnten daher die Konformation der chromosomalen DNS erheblich beeinflussen, z. B. die Ausbildung von Triple-Formationen. Da die Tertiärstruktur von Proteinen durch denaturierende Agenzien erheblich gestört werden kann, könnte auch hier Formamid beispielsweise einen die In-situ-Hybridisierung letztlich behindernden Einfluß haben.

Ähnliche Überlegungen wie für Formamid gelten auch für andere denaturierende Agenzien, d. h. Agenzien, die zum Aufbrechen von H-Bindungen eingesetzt werden, sowie für thermale Einwirkungen, die den gleichen Effekt haben.

Die bekannten Verfahren haben jedoch erhebliche Nachteile. Es gibt verschiedene Verfahrensansätze, um zu einer kombinierten Charakterisierung von Zellen durch immunologische Techniken (IT) und In-situ-Hybridisierungs-Methoden von chromosomalen Zielobjekten zu gelangen. Alle diese beschriebenen Verfahrensansätze sind jedoch auf natürlich vorkommende, gegenüber thermaler In-situ-Denaturierung und/oder Behandlung mit denaturierenden Agenzien (z. B. Formamid) ausreichend resistente, immunologisch bedeutsame Strukturen beschränkt oder auf die präparative Erzeugung resistenter, immunologischer Strukturen.

Ein allgemeiner Weg zur Realisierung einer gleichzeitigen Charakterisierung von Zellen durch immunologische Techniken (IT) und In-situ-Hybridisierungsmethoden von chromosomalen Zielobjekten wurde bei den derzeit verwendeten In-situ-Hybridisierungsverfahren bisher nicht gesehen, da die hierbei benutzten Präparationsschritte die immunologische Färbung wesentlich beeinträchtigten.

Hier will die Erfindung Abhilfe schaffen und das Verfahren der Hybridisierung vereinfachen bzw. unter Einsparung von Verfahrensschritten ökonomischer durchführen, wobei die zu untersuchenden Zellen und deren Verbindungen schonender behandelt werden können.

Gelöst wird die Aufgabe erfindungsgemäß dadurch, daß die Hybridisierungsmixtur aus markierten Proben, einer Pufferlösung, einem Zielobjekt unter Weglassung denaturierender Agenzien besteht und daß das Gemisch einer Temperaturbehandlung zwischen 2–100°C unterzogen wird.

Auf diese Weise ist eine Vereinfachung und Reduzierung der Verfahrensschritte möglich. Wesentlich ist hierbei, daß die denaturierenden Agenzien weggelassen werden, wodurch man eine schonendere Behandlung der Zielobjekte bzw. der Targets erreicht, insbesondere deshalb, weil aufwendige Verfahrensschritte, gekoppelt an den Gebrauch denaturierender Agenzien, die bisher zwingend notwendig erschienen, eingespart werden können. Durch die Reduktion der Verfahrensschritte sowie durch die Zeitersparnis ist ebenfalls eine gute Morphologie des chromosomalen Materials in Verbindung mit einer guten Visualisierung der markierten Proben vorhanden. Ferner kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine bessere Detektierung mittels automatischer Systeme, beispielsweise automatische Bildanalyse, erfolgen. Durch seine Einfachheit und die Schnelligkeit ist das Verfahren auch geeignet, größere Mengen an Material in sehr kurzer Zeit zu untersuchen bzw. auszuwerten. Es lassen sich insbesondere statistische Untersuchungsmethoden optimal einsetzen, z. B. in der Erfassung strahleninduzierter bzw. chemisch induzierter Chromosomenveränderungen im Niedrigdosisbereich. Es kann auf einfache Weise der Einfluß geringer Strahlungsdosen an den Chromosomen nachgewiesen werden, so daß sich Aberrationsraten bzw. -veränderungen bestimmen lassen.

Von besonderem Vorteil ist es, daß man ohne denaturierende Agenzien, z. B. Formamid, und ohne enzymatische Behandlung bei der In-situ-Hybridisierung auskommen kann und daß die In-situ-Hybridisierung von Proben an chromosomalen Zielobjekten bei niedrigen, insbesondere bei Temperaturen kleiner als 55°C erfolgt. Das hat den Vorteil, daß das erfindungsgemäße Verfahren in sehr kurzer Zeit, d. h. in weniger als drei Stunden, realisiert werden kann. Denaturierende Agenzien bzw. enzymatische Behandlungen zur Erzeugung einzelsträngiger DNS-Abschnitte sind bei der Durchführung der In-situ-Hybridisierung des Zielobjekts nicht mehr erforderlich; dies gilt auch für physikalische, denaturierende Agenzien, z. B. UV-Licht und/oder ionisierende Strahlung.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu für spezifische In-situ-Hybridisierungen charakteristischen Markierungen, obwohl während der gesamten In-situ-Hybridisierungs-Prozedur das Zielobjekt nicht mit denaturierenden Agenzien, z. B. Formamid oder NaOH etc., behandelt wurde. Auch in der Hybridisierungsmixtur sind kein derartiges denaturierendes Agens oder Einzelstrang-DNS erzeugende Enzyme erforderlich.

Eine zusätzliche Möglichkeit ist gemäß einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß die Hybridisierungsmixtur einer Temperaturbehandlung zwischen 90–100°C, insbesondere auch zwischen 18–95°C, unterzogen wird.

Die optimale Hybridisierungstemperatur ist von dem Puffer und der Ionenkonzentration abhängig, beispielsweise in physiologischer NaCl-Lösung liegt das Optimum zwischen 94 und 98°C.

Es ist erfindungswesentlich, daß auch bei niedrigen Temperaturen (NT;  $T \leq 5^\circ\text{C}$ ) die außerordentlich stabilen ds-DNS-PNA-Komplexe (auch ds-DNS-PNA ist bei NT stabil) zu einer effektiven In-situ-Hybridisierung

oder NT-Insitu-Hybridisierung führen, selbst wenn die Zahl der Basen bei PNA Sequenzen, die zu brauchbaren ds-DNS-PNA-Komplexen führen, relativ klein bleibt.

Durch die erfindungsgemäße In-situ-Hybridisierung wurde auch erreicht, daß die vorher durch Hitzebehandlung denaturierte, dann aber auf Eis unter 0°C abgekühlte und anschließend wieder aufgetaute Proben-DNS bei Temperaturen von 25°C appliziert werden konnte.

Mit Hilfe von Antikörpern gegen synthetisch erzeugte Triplex-DNS wurde gezeigt, daß derartige Triple-Formationen in Chromosomen verschiedener Eukaryontenspezies, insbesondere auch in Chromosomen menschlicher Zellen, weit verbreitet sind. Ihr Anteil in Säugerzellen wird auf ca. 0,5% der Gesamt-DNS geschätzt. In-situ-Hybridisierungen können bereits zu lichtmikroskopisch sichtbaren Signalen führen, wenn nur 3% der Zielobjekt-DNS hybridisiert wird. Mit Hilfe der neu eingeführten, Photonen zählenden, hochauflösenden CCD-Kameras für die quantitative Mikroskopie ist eine Visualisierung selbst dann möglich, wenn ein sehr geringer Anteil von Triple-Formationen im Zielobjekt vorliegt, z. B. 0,5%, da mit den neuen Aufnahmetechniken selbst solche In-situ-Hybridisierungs-Signale registriert werden können, die sich einer direkten lichtmikroskopischen Visualisierung entziehen.

Es ist besonders vorteilhaft, daß die oben beschriebenen ungewöhnlichen DNS-Strukturen zu einer effektiven In-situ-Hybridisierung oder NT-In-situ-Hybridisierung an chromosomalen Zielobjekten führen können. Die Triple-Bildung ist, ebenso wie andere ungewöhnliche DNS-Strukturen, sequenzabhängig. Im Vordergrund der Anwendungen von synthetischen Oligonukleotiden für Tripleformationen steht die spezifische Blockierung der Genexpression.

Proteine können für einzelsträngige, doppelsträngige oder auch für Triple-DNS sequenzspezifisch sein und können auch Bindungsstellen beispielsweise für doppelsträngige-DNS haben. Hieraus ergeben sich weitere grundsätzliche Möglichkeiten einer In-situ-Hybridisierung. Zum Beispiel bindet ein Protein sequenzspezifisch an einen chromosomalen DNS-Abschnitt und in sequenzspezifischer Weise die Proben-Nukleinsäure. Auch Dimerisierungsmodelle, zwei sequenzspezifische Proteine, die sich zusammenlagern, sind realisierbar.

Der Fortfall bzw. die starke Reduktion von denaturierenden Agenzien oder enzymatischen Behandlungen ist ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die NT-In-situ-Hybridisierung ist dort vorteilhaft, wo eine möglichst schonende Behandlung des Zielobjekts wünschenswert oder erforderlich ist, z. B. bei der gleichzeitigen Charakterisierung von Zellen mit IT und In-situ-Hybridisierungs-Techniken.

Bei der erfindungsgemäßen NT-In-situ-Hybridisierung wurden die Chromosomen mit Fixierverfahren (Methanol/Eisessig) behandelt; diese stellen jedoch keine denaturierenden Agenzien dar und sind für den Hybridisierungsvorgang als solchen nicht erforderlich.

Für eine gleichzeitige immunologische Färbung und NT-In-situ-Hybridisierung wird ein Verfahren angewandt, das eine ausreichende Permeabilisierung der Zellmembran zuläßt, ohne sie zu zerstören und ohne die Antigen-Expression der Zelloberfläche entscheidend zu verändern.

Je nach den Gegebenheiten ist es möglich, das In-situ-Hybridisierungsverfahren mit ein- oder doppelsträngigen Proben durchzuführen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Lösung ist schließlich vorgesehen, daß die Insitu-Hybridisierung von Proben an Zielobjekte (Targets) bei niedrigen Temperaturen erfolgt, wobei die Zielobjekte einzelsträngig oder doppelsträngig oder triplesträngig oder mehrsträngig und nach der Hybridisierung doppel- oder mehrsträngig sind.

Das Verfahren kann in vorteilhafter Weise zwischen 2–100°C, zwischen 15–100°C, zwischen 20–100°C, zwischen 20–95°C, zwischen 42–95°C, zwischen 20–60°C oder auch bei einer Temperatur von ca. 50°C durchgeführt werden. Dabei ist es möglich, daß die Temperatur geringfügig um  $\pm 5^\circ\text{C}$  höher oder niedriger als bei der Temperaturbehandlung der Hybridisierungsmixtur eingestellt wird.

Von besonderer Bedeutung ist für die vorliegende Erfindung, daß die Lebensfähigkeit von Zielobjektzellen nicht entscheidend durch das Verfahren beeinträchtigt wird. Zur besseren Bindung an doppelsträngige native spezifische Sequenzabschnitte der Zielobjekt-DNS können auch Proben mit geeignet modifiziertem oder ersetztem Zucker-Phosphat-Rückgrat verwendet werden. Sequenz bedeutet hier ein Molekül mit einer bestimmten Reihenfolge der Basen, sei sie nativ oder synthetisch, mit normalem, modifiziertem oder ersetztem Zucker-Phosphat-Rückgrat.

Vorteilhaft ist es ferner in bestimmten Fällen, daß die Hybridisierungsmixtur von einer hohen Temperatur auf eine niedrige Temperatur abgekühlt wird und daß die Temperaturdifferenz zwischen 10–40°C oder 40–50°C oder 50–80°C oder 60–75°C oder 50–75°C oder 40–75°C und zwischen 45–50°C oder 40–100°C liegt.

Hierzu ist es vorteilhaft, daß die Zeitdauer für den Abkühlvorgang der Hybridisierungsmixtur mindestens 30 Minuten beträgt.

Soweit die Denaturierung des Zielobjekts entfällt, wird die Verfahrensdauer stark gekürzt, weil keine weitere Behandlung des Gemisches mehr notwendig ist. Ferner kann nach der Denaturierung die bisher übliche Behandlung entfallen. Außerdem ist es vorteilhaft, daß auf die Fixierung des Zielobjekts mit Eisessig oder Methanol verzichtet werden kann.

Außerdem ist es vorteilhaft, daß geringe Mengen von denaturierenden Agenzien zwischen 0–10% der Gesamthybridisierungsmixtur in den zur Behandlung benutzten Puffer bzw. Medium bei Behandlung des Zielobjektes der Insitu-Hybridisierungsprozedur eingesetzt werden.

Vorteilhaft ist es ferner, daß der Testkit aus mindestens einem Puffer und aus Proben, insbesondere aus amplifizierten, und/oder markierten oder anderen künstlich hergestellten Proben besteht und daß für den Testkit eine Waschlösung vorgesehen ist, insbesondere eine Waschlösung, die keine denaturierenden Agenzien enthält, so daß entscheidende Waschschriffe eingespart werden können.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist es vorteilhaft, daß die im Testkit enthaltenen Antikörper gegen spezifische zelluläre Antigene gerichtet sind und daß die im Testkit enthaltenen Proben markiert sind, insbesondere mit modifizierten Nukleotiden für direkte oder indirekte Immunofluoreszenz bzw. radioaktive Detektion oder anderen künstlich hergestellten Proben.

Vorteilhaft ist ferner, daß der Testkit sekundäre Antikörper enthält, der gegen den primären Antikörper gerichtet und markiert ist. Hierzu ist es vorteilhaft, daß die Pufferlösung aus physiologischem NaCl besteht und

daß als Pufferlösung ein Puffer eingesetzt wird, der für die Polymerase-Kettenreaktion einsetzbar ist, wobei zusätzlich gesättigtes Zitronensäurezitrat ohne denaturierende Agenzien enthalten sein kann.

Vorteilhaft ist es auch, daß in einer Pufferlösung von einer einfachen Konzentration zwischen 1 und 20 mmol/ltr TRIS-HCL zwischen 1 und 5 mmol, insbesondere 3 mmol  $MgCl_2$  zwischen 1 und 60 mmol/ltr KCl und zwischen 1 und 10  $\mu g/ml$  Gelatine und/oder anstelle von KCl und Gelatine Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate 0,1–50 mg/ml und/oder Octylphenol Ethylene Oxyde Kondensat zwischen 0,1 und 50 mg/ml enthalten ist und daß die Pufferlösung einen PH-Wert zwischen 7,8 und 6,7, insbesondere 8,3, aufweist, wobei in einer Pufferlösung eine Puffersubstanz, insbesondere TRIS-HCL und/oder MES und/oder  $K_2HPO_4$  bzw.  $K_2H_2PO_4$  und  $MgCl_2$  enthalten ist. Vorteilhaft ist es, daß in der Pufferlösung Detergenzien enthalten sind.

Eine zusätzliche Möglichkeit ist gemäß einer Weiterbildung der erfindungsgemäßen Vorrichtung, daß geringe Mengen an denaturierenden Agenzien zwischen 0–5% der Gesamthybridisierungsmixtur in den zur Behandlung benutzten Puffer bei der Behandlung des Zielobjekts der In-situ-Hybridisierungsprozedur zugesetzt werden.

Da nur geringe Mengen an denaturierenden Agenzien der Gesamthybridisierungsmixtur in dem zur Behandlung benutzten Puffer bei der Behandlung des Zielobjekts der In-situ-Hybridisierungsprozedur zugesetzt werden können, kann eine schonende Behandlung der Proben und des Zielobjekts erfolgen.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist es vorteilhaft, daß die Pufferbestandteile der Hybridisierungsmixtur vor der Amplifikation der Proben-DNS zugegeben werden.

Eine zusätzliche Möglichkeit gemäß einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Zugabe der Pufferbestandteile der Hybridisierung vor der Hybridisierung der Proben-DNS an das Zielobjekt erfolgt.

Eine wesentliche, vorteilhafte Ausführungsform erreicht man dadurch, daß die In-situ-Hybridisierung in demselben einzelnen Puffersystem wie die Amplifikation der Probe mittels Polymerase-Kettenreaktion lediglich unter Zugabe von gesättigtem Zitronensäurezitrat erfolgt.

Vorteilhaft ist es außerdem, daß zur sequenzspezifischen Anlagerung von Proben an zelluläre Zielobjekte bzw. im Organismus natürlicherweise vorgefundene Sequenzen in Verbindung mit physiologischen Pufferbedingungen benutzt werden.

Ferner ist es vorteilhaft, daß die Präparate durch immunologische Färbung und gleichzeitig durch In-situ-Hybridisierungsfärbung analysiert werden, dergestalt, daß die Zelle weitgehend unbeschädigt bleibt und gleichzeitig die Zielobjekte gut kenntlich gemacht werden können.

Eine zusätzliche Möglichkeit ist gemäß einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß die in den Zellen hybridisierten Proben nach Immobilisierung der Zellen auf Objektträgern oder in Suspension, nach einer Niedrigtemperatur-In-situ-Hybridisierung in Verbindung mit Oberflächenmarkern bzw. biochemischen Gemische-Markern mit Absorptions- oder Fluoreszenz-immunologischen Verfahren oder anderen künstlich hergestellten Markern visualisiert werden.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist es vorteilhaft, daß die Analyse der Präparate gleichzeitig nach

Oberflächenantigenen und Chromosomenveränderungen mit beliebiger Länge der markierten Zielobjekt-Sequenz bei mikroskopischer Beobachtung und/oder digitaler Mikroskopie und/oder fluß-zytometrischen Techniken erfolgt. Hierdurch lassen sich die einzelnen Zielobjekte in sehr kurzer Zeit klassifizieren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Lösung ist schließlich vorgesehen, daß die Kernfärbung bzw. Zytoplasmafärbung bei gleichzeitiger Analyse der Präparate nach Oberflächen-Antigenen und numerischen bzw. strukturellen Chromosomenveränderungen erfolgt.

Im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es vorteilhaft, daß bei dem Zielobjekt vor Beginn der In-situ-Hybridisierung die Permeabilität der zellulären Membranen mit Detergenzien erhöht wird.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung sind in den Patentansprüchen und in der Beschreibung erläutert, wobei bemerkt wird, daß alle Einzelmerkmale und alle Kombinationen von Einzelmerkmalen erfindungswesentlich sind.

Das nachstehend beschriebene Verfahren dient zur Präparierung und Hybridisierung von spezifischen Proben, insbesondere nativen Nukleinsäuren oder PNA-Proben, oder anderen künstlich hergestellten Proben, die eine spezifische Sequenz von Nukleotiden aufweisen, wobei die Proben mit modifizierten Nukleotiden markiert und durch In-situ-Hybridisierung mit den spezifischen Stellen des Zielobjekts hybridisiert werden. Die Proben werden mit modifizierten Nukleotiden markiert. Die Hybridisierungsmixtur, bestehend aus Proben, Pufferflüssigkeit und Zielobjekt, wird dann einer Temperaturbehandlung zwischen 2–100°C unterzogen. Die Temperaturbehandlung kann auch zwischen 15–95°C, zwischen 20°C und 75°C, zwischen 20°C und 65°C, zwischen 20°C und 55°C oder zwischen 25°C und 75°C erfolgen.

Dabei ist es wichtig, daß die Hybridisierungsmixtur abgekühlt wird und die Temperaturdifferenz zwischen 40°C und 90°C, zwischen 40°C und 75°C, zwischen 40°C und 65°C, zwischen 40°C und 55°C oder zwischen 40°C und 50°C liegt.

Eine wesentliche Erweiterung und Vereinfachung der Möglichkeiten der Chromosomen-Diagnostik in sich teilenden Zellen (= Mitose), aber auch in sich nicht teilenden Zellen (= Interphase/Zellkern) ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich. Das neue Verfahren erlaubt die vereinfachte selektive Färbung von ganzen Chromosomen, Chromosomenabschnitten und Genen bis hinunter zu wenigen hundert Basenpaaren Länge.

Im folgenden soll das Verfahren der In-situ-Hybridisierung von Nukleinsäure- oder anderen Proben beschrieben werden. Die Proben weisen eine spezifische Abfolge von Basen auf. Die Proben werden mit modifizierten Nukleotiden markiert und durch die In-situ-Hybridisierung an die speziellen Stellen des Zielobjekts bzw. Genoms herangebracht und die entstandene Hybridisierungsmixtur einer Temperaturbehandlung zwischen 2–100°C unterzogen.

Die Visualisierung der durch den eigentlichen In-situ-Hybridisierungsvorgang sequenzspezifisch an das Zielobjekt angelagerten Proben-Sequenzen erfolgt durch Applikation der hierzu vorher modifizierten Proben und durch geeignete, beispielsweise immunocytochemische, Färbeverfahren.

Eine besonders wichtige Anwendung stellt die Verwendung von In-situ-Hybridisierungs-Verfahren in der klinischen Tumordiagnostik inklusive Therapieplanung,

Prognostik, Therapiekontrolle dar. Es wird allgemein erwartet, daß die In-situ-Hybridisierungs-Methoden eine wesentlich weitere Verbreitung finden und sich zu Standardmethoden der klinischen Laboratoriumsdiagnostik entwickeln werden.

Die In-situ-Hybridisierungsmethoden dienen auch zum Nachweis von freien zellulären Ribonukleinsäuren (frei: nicht an chromosomale Zielobjekte gebunden). Diese im folgenden als In-situ-Hybridisierung-R bezeichnete Sonderform der In-situ-Hybridisierung ist ebenfalls von erheblicher potentieller Bedeutung für klinische Anwendungen, insbesondere in Kombination mit der In-situ-Hybridisierung an chromosomale Zielobjekte.

Bei dem Verfahren zur In-situ-Hybridisierung wird zu keinem Zeitpunkt der In-situ-Hybridisierungs-Prozedur bis zu ihrem vollständigen Abschluß die Behandlung des Zielobjekts mit denaturierenden Agenzien, z. B. Formamid, NaOH (allgemein: Agenzien zur Auftrennung mehrsträngiger DNS in einzelsträngige DNS) oder mit Einzelstrang erzeugenden Enzymen durchgeführt. Fixierende Agenzien, z. B. Methanol/Eisessig, Glutaraldehyd, Formaldehyd, Paraformaldehyd u. ä., werden in diesem Zusammenhang nicht als denaturierende Agenzien angesehen.

Eine Stringenzregelung bzw. Verhinderung der Bindung von Proben an chromosomale Zielobjekte geringerer Komplementarität kann auch durch eine geeignete Einstellung der Hybridisierungstemperatur erfolgen, die in Abhängigkeit vom jeweiligen Puffer in der Probe zwischen 2°C und 100°C liegen kann. Dies ist auch insofern von großer Bedeutung, als es erlaubt, im Hybridisierungspuffer bereits die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation der Proben-Nukleinsäure durchzuführen.

Alle Puffer für die Polymerase-Kettenreaktion können für die In-situ-Hybridisierung bei entsprechender Temperatureinstellung unter Zugabe von gesättigtem Zitrat eingesetzt werden.

Die bis zu dem gewünschten Abschluß der Hybridisierung erforderliche Zeit kann wesentlich kürzer sein als die unter gleichen Proben- und Zielobjektbedingungen bei Verwendung denaturierender Agenzien benötigte Zeitdauer.

Ferner ist es wichtig, daß bei diesem Verfahren keine enzymatische Behandlung zur Erzeugung einzelsträngiger DNS in den Zielobjekten, z. B. durch Einwirkung von Exonukleasen, durchgeführt wird.

Es können nach einem weiteren Ausführungsbeispiel auch geringe Mengen an denaturierenden Agenzien bis zu 20% in der In-situ-Hybridisierungs-Prozedur eingesetzt werden.

Die Amplifikation der Proben mittels Polymerase-Kettenreaktion oder anderer Amplifizierungsverfahren sowie die In-situ-Hybridisierung erfolgen in dem beschriebenen Puffersystem. Die Amplifikation der Proben kann auch gleichzeitig mit einer Markierung durch den Einbau modifizierter Nukleotide erfolgen.

Die Konzentration an denaturierenden Agenzien beträgt zwischen 0–20% der Hybridisierungsmixtur. Somit wird die Lebensfähigkeit von Zielobjektzellen nicht entscheidend durch das Verfahren beeinträchtigt.

Fehlen jedoch denaturierende Agenzien im Hybridisierungspuffer, dann ist es möglich, die Amplifikation der DNS-Proben mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktions-Methode und die Hybridisierung in demselben Puffer und Zugabe von Zitrat durchzuführen. Dieser Erfindungsgedanke ist von erheblicher praktischer Bedeutung, weil er die Durchführung des Verfahrens wesentlich vereinfacht.

Da Hybridisierungen bei niedriger Temperatur ohne denaturierende Agenzien und bei physiologischen Bedingungen unter Verwendung von Proben mit nativen Sequenzen möglich sind, bedeutet dies, die Blockierung von Genaktivitäten aufgrund spezifischer Triplex-Bildungen oder anderer "ungewöhnlicher" DNS-Strukturen ganz wesentlich zu erweitern; insofern ist die Menge der hierzu in Frage kommenden Sequenzen um ein Vielfaches erweitert worden. In diesem Fall kann die Modifikation der Proben entfallen.

Eine gleichzeitige Evaluierung von Präparaten nach In-situ-Hybridisierungs-Parametern und immunologischen Parametern, z. B. Oberflächenantigenen, ist für die klinische Diagnostik von großer Bedeutung. Ein Gebrauchsskit (Gebinde) für In-situ-Hybridisierung ist nachfolgend beschrieben. Es besteht aus vier Gefäßen. Die Gefäße 2 und 3 enthalten den Puffer, das Gefäß 1 die Proben-DNS und das Gefäß 4 die physiologische Kochsalzlösung.

Gefäß Nr. 1 enthält eine beliebige Menge schon markierter Proben in H<sub>2</sub>O. Markierung in diesem Fall: Nukleotide markiert für indirekte Immunofluoreszenz (z. B. Antikörper), Nukleotide markiert mit direkter Immunofluoreszenz, radioaktiv modifizierte Nukleotide oder andere künstlich hergestellte Proben.

Gefäß Nr. 2 enthält Hybridisierungspuffer 10\*:  
Tris-HCl 1—200 mmol/l  
MgCl<sub>2</sub> 1—50 mmol/l  
KCl 1—600 mmol/l  
Gelatine 1—10 mg/l

Anstatt KCl und Gelatine ist im Gefäß Nr. 3: Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate 0,1—50 mg/l  
Octylphenol Ethylene Oxyde Kondensate 0,1—50mg/l enthalten.

Anstatt des Hybridisierungspuffers gemäß dem Inhalt im Gefäß Nr. 2 oder 3 ist eine Physiologische Kochsalzlösung enthalten.

Vorteilhaft ist es, wenn im Puffer (Gefäß 2, 3) gesättigtes Zitronensäurezitrat enthalten ist.

Der Kit besteht aus den vier Gefäßen Nr. 1 bis 4. Für den Waschschrift nach der Hybridisierung muß zusätzlich noch physiologische Kochsalzlösung (0,9 Vol-% NaCl) selbst hergestellt werden und mit oder ohne 0,2 Vol-% Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate (Tween 20) für den einen Waschschrift versetzt werden.

Ebenso wird bei indirekter Immunofluoreszenz die Antikörperanbindung in physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen, und zwar mit oder ohne Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate (Tween 20). Waschschrift nach Antikörperanbindung in physiologischer Kochsalzlösung.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Präparierung und Hybridisierung von spezifischen Proben, insbesondere nativen Nukleinsäuren oder PNA-Proben, oder anderen künstlich hergestellten Proben, die eine spezifische Sequenz von Nukleotiden aufweisen, wobei die Proben mit modifizierten Nukleotiden markiert und durch In-situ-Hybridisierung mit den spezifischen Stellen des Zielobjekts hybridisiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsmixtur aus markierten Proben, einer Pufferlösung, einem Zielobjekt unter Weglassung denaturierender Agenzien besteht und daß das Gemisch

einer Temperaturbehandlung zwischen 2–100°C unterzogen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsmixtur einer Temperaturbehandlung zwischen 90–100°C unterzogen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die In-situ-Hybridisierung von Proben an chromosomalen Zielobjekten bei niedrigen, insbesondere bei Temperaturen kleiner als 55°C erfolgt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die In-situ-Hybridisierung von Proben an Zielobjekten (Targets) bei niedrigen Temperaturen erfolgt, wobei die Zielobjekte einzelsträngig oder doppelsträngig oder triplesträngig oder mehrsträngig und nach der Hybridisierung doppel- oder mehrsträngig sind.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsmixtur einer Temperaturbehandlung zwischen 2–100°C, zwischen 15–100°C, zwischen 20–100°C, zwischen 20–95°C, zwischen 42–95°C, zwischen 20–60°C oder auch bei einer Temperatur von ca. 50°C unterzogen wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsmixtur von einer hohen Temperatur auf eine niedrige Temperatur abgekühlt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperaturdifferenz zwischen 10–40°C oder 40–50°C oder 50–80°C oder 60–75°C oder 50–75°C oder 40–75°C oder 40–100°C liegt.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperaturdifferenz zwischen 45–50°C liegt.

9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeitdauer für den Abkühlvorgang der Hybridisierungsmixtur mindestens 30 Minuten beträgt.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß geringe Mengen von denaturierenden Agenzien zwischen 0–10% der Gesamthybridisierungsmixtur in den zur Behandlung benutzten Puffer bzw. Medium bei Behandlung des Zielobjekts der In-situ-Hybridisierungsprozedur eingesetzt werden.

11. Testkit für eine In-situ-Hybridisierung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Testkit aus mindestens einem Puffer und aus Proben, insbesondere aus amplifizierten und/oder markierten oder anderen künstlich hergestellten Proben besteht.

12. Testkit für eine In-situ-Hybridisierung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für den Testkit eine Waschlösung vorgesehen ist, insbesondere eine Waschlösung, die keine denaturierenden Agenzien enthält.

13. Testkit für eine In-situ-Hybridisierung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im Testkit enthaltene Antikörper gegen spezifische zelluläre Antigene gerichtet sind.

14. Testkit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß im Testkit enthaltene Proben markiert sind, insbesondere mit modifizierten Nukleotiden für direkte oder indirekte Immunofluoreszenz bzw. radioaktive Detektion oder anderen

künstlich hergestellten Proben.

15. Testkit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Testkit sekundäre Antikörper enthält, der gegen den primären Antikörper gerichtet und markiert ist.

16. Pufferlösung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferlösung aus physiologischem NaCl besteht.

17. Pufferlösung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Pufferlösung ein Puffer eingesetzt wird, der für die Polymerase-Kettenreaktion einsetzbar ist, wobei zusätzlich gesättigtes Zitronensäurezitatrat ohne denaturierende Agenzien enthalten ist.

18. Pufferlösung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in einer Pufferlösung von einer einfachen Konzentration zwischen 1 und 20 mmol/ltr TRIS-HCL zwischen 1 und 50 mmol, insbesondere 3 mmol MgCl<sub>2</sub>, zwischen 1 und 60 mmol/ltr KCl und zwischen 1 und 10 µg/ml Gelatine und/oder anstelle von KCl und Gelatine Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate 0,1–50 mg/ml und/oder Octylphenol Ethylene Oxyde Kondensat zwischen 0,1 und 50 mg/ml enthalten ist.

19. Pufferlösung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferlösung einen PH-Wert zwischen 7,8 und 6,7, insbesondere 8,3, aufweist.

20. Pufferlösung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in einer Pufferlösung eine Puffersubstanz, insbesondere TRIS-HCL und/oder MES und/oder K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bzw. K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und MgCl<sub>2</sub>, enthalten ist.

21. Pufferlösung nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der Pufferlösung Detergenzien enthalten sind.

22. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß geringe Mengen an denaturierenden Agenzien zwischen 0–5% der Gesamthybridisierungsmixtur in den zur Behandlung benutzten Puffer bei der Behandlung des Zielobjekts der In-situ-Hybridisierungsprozedur zugesetzt werden.

23. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferbestandteile der Hybridisierungsmixtur vor der Amplifikation der Proben zugegeben werden.

24. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zugabe der Pufferbestandteile der Hybridisierung vor der Hybridisierung der Proben an das Zielobjekt erfolgt.

25. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation von Proben, insbesondere Proben-DNS sowie die In-situ-Hybridisierung in demselben einzelnen Puffersystem unter Zugabe von gesättigtem Zitronensäurezitatrat erfolgt.

26. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß zur sequenzspezifischen Anlagerung von Proben an zelluläre Zielobjekte bzw. im Organismus natürlicherweise vorgefundene Sequenzen in Verbindung mit physiologischen Pufferbedingungen benutzt werden.

27. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Präparate durch immunologische Färbung und gleichzeitig durch In-situ-Hybridisierungsfärbung analysiert werden.

28. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Zellen hybridisierten Proben nach Immobilisierung der Zellen auf Objektträgern oder in Suspension, nach einer Niedrigtemperatur-In-situ-Hybridisierung in Verbindung mit Oberflächenmarkern bzw. biochemischen Gemische-Markern mit Absorptions- oder Fluoreszenz-immunologischen Verfahren oder anderen künstlich hergestellten Markern visualisiert werden.

29. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse der Präparate gleichzeitig nach Oberflächenantigenen und Chromosomenveränderungen mit beliebiger Länge der markierten Zielobjekt-Sequenz bei mikroskopischer Beobachtung und/oder digitaler Mikroskopie und/oder fluß-zytometrischen Techniken erfolgt.

30. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kernfärbung bzw. Zytoplasmafärbung bei gleichzeitiger Analyse der Präparate nach Oberflächen-Antigenen und numerischen bzw. strukturellen Chromosomenveränderungen erfolgt.

31. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß bei dem Zielobjekt vor Beginn der In-situ-Hybridisierung die Permeabilität der zellulären Membranen mit Detergenzien erhöht wird.